

**РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПТИЧЬЕГО ГРИППА НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ\*****О.А. КОНДАКОВА, Е.А. ТРИФОНОВА, М.В. АРХИПЕНКО, Н.А. НИКИТИН,  
О.В. КАРПОВА, И.Г. АТАБЕКОВ**

Птичий грипп — инфекционная вирусная болезнь, поражающая разные виды пернатых, включая домашнюю птицу (кур, индюков, уток и гусей). Вакцинация остается ключевой стратегией в предотвращении эпизоотий и эпидемий птичьего гриппа. При этом на сегодняшний день актуальная задача заключается в разработке и внедрении быстрых, безопасных и высокопроизводительных методов при производстве вакцин против гриппа. Применение рекомбинантных антигенных детерминант в вакцинных препаратах рассматривается как перспективный подход для создания универсальных, безопасных и эффективных вакцин. Одно из решений проблемы низкой иммуногенности вакцинных белков — использование вирусов растений и вирусоподобных частиц в качестве платформы для презентации антигенов и усиления иммунного ответа. Ранее нами было показано, что при нагревании палочковидного вируса табачной мозаики происходит образование частиц сферической формы (СЧ), обладающих уникальными адсорбционными и иммуностимулирующими свойствами. В представляемой работе разработана вакцина против вируса гриппа А птиц (штамм H5N1), созданная посредством сборки *in vitro* комплексов, включающих антигенные детерминанты вируса на поверхности СЧ. Методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии показана антигенная активность рекомбинантных вирусных белков — гематоглотинина HA и нееклеточного домена матричного белка M2 (M2e), адсорбированных на СЧ. Полученные комплексы СЧ—HA-M2e (СЧ—HA62/284-M2e) оказались высокоиммуногенными. При иммунизации лабораторных животных подтверждено образование специфических антител к обоим антигенным детерминантам вируса гриппа А птиц. Адсорбция HA и M2e на СЧ позволила в 10 раз увеличить выработку антител к антигенам в крови иммунизированных животных. Преимущество использованного подхода при создании вакцинных препаратов — высокая эффективность, основанная на стабильности и адьювантной активности сферических частиц, безопасность и низкая себестоимость использования вирусов растений. Получение ветеринарных вакцин на основе структурно модифицированных вирусов растений позволяет создать отечественные маркерные ветеринарные вакцины для оздоровления популяции птицы в агропромышленных комплексах. Полученная вакцина может рассматриваться в качестве кандидатной рекомбинантной вакцины против вируса гриппа птиц.

**Ключевые слова:** вирусы растений, вакцины, сферические частицы, вирус гриппа А, рекомбинантные белки.

Грипп относится к наиболее заразным и быстро распространяющимся инфекционным заболеваниям (1). Его возбудители — РНК-содержащие вирусы семейства *Orthomyxoviridae*. Хотя природным резервуаром вируса гриппа А служат дикие птицы, эти вирусы могут заражать также домашнюю птицу и несколько видов млекопитающих, включая человека. Эпизоотии, этиологически связанные с вирусом гриппа А, наносят заметный ущерб сельскому хозяйству. В настоящее время борьба с гриппом птиц предполагает введение карантинных, а также забой инфицированных и контактировавших с ними особей, что приводит к значительным экономическим потерям. Из всех вирусов гриппа, циркулирующих среди птиц, наибольшую опасность для человека представляет штамм H5N1 в связи с большим числом случаев заражения людей при контакте с инфицированными птицами и самым высоким процентом смертельных исходов (2).

Наиболее эффективным способом профилактики эпидемий и эпизоотий гриппа считается вакцинация. Для получения современных лицензированных вакцин против вирусов гриппа используют куриные эмбрионы, и производство таких вакцин для каждого штамма занимает до 6-9 мес, что в случае появления нового пандемического штамма может иметь не-

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках приоритетного направления деятельности РНФ «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований коллективами существующих научных лабораторий (кафедр)» (грант № 14-24-00007).

предсказуемые последствия. Кроме того, применение традиционных методов ограничено высокой вирулентностью штамма H5N1 для цыплят, куриных эмбрионов и потенциальной опасностью для человека.

Конструирование рекомбинантных белков рассматривается как альтернативный подход для создания универсальных, безопасных и эффективных вакцин против вируса птичьего гриппа (3). Однако в ряде работ сообщается, что наиболее перспективные для включения в вакцину вирусные белки (поверхностный белок гемагглютинин HA, который служит основной мишенью для нейтрализующих антител, и консервативный матриксный белок M2) имеют низкую иммуногенность и не могут стимулировать эффективный иммунный ответ (4-7). Одно из решений проблемы — использование вирусов растений (8-10) и вирусоподобных частиц на их основе для презентации эпитопов протективных антигенов и усиления иммунного ответа (11-15).

Ранее мы показали, что при нагревании спирального вириона вируса табачной мозаики (VTM) до 94 °C происходит структурная перестройка вирусного белка и формируются сферические частицы (СЧ) контролируемого размера. Такие СЧ биodeградируемы, не содержат РНК и обладают высокой стабильностью. Кроме того, СЧ безопасны для человека, так как растения и животные не имеют общих патогенов (16-19). В то же время СЧ — эффективные иммуностимуляторы (11).

В настоящем исследовании для создания ветеринарной кандидатной вакцины использованы уникальные, не имеющие аналогов частицы — СЧ. Впервые получены комплексы СЧ—HA62/284-M2e, содержащие сферические частицы, образованные при термической перестройке VTM, и адсорбированные на их поверхности рекомбинантные антигены HA62/284 и M2e вируса гриппа А, и продемонстрировано сохранение антигенной специфичности рекомбинантных белков. Такие комплексы оказались высокоиммуногенными: при иммунизации лабораторных животных показана выработка специфических антител к обоим антигенным детерминантам вируса гриппа А птиц.

Цель представляемой работы заключалась в разработке рекомбинантной кандидатной вакцины нового поколения против вируса птичьего гриппа, полученной посредством сборки *in vitro* комплексов, включающих иммуногенные эпитопы белков HA и M2 вируса гриппа А на поверхности сферических частиц на основе вириона вируса табачной мозаики.

**Методика.** Вирионы VTM (штамм U1) выделяли из инфицированных растений *Nicotiana tabacum* L. сорта Samsun, как описано ранее (20). СЧ получали из очищенного препарата VTM (5 мг/мл) при 94 °C согласно протоколу (18).

Рекомбинантный белок, содержащий фрагмент молекулы HA вируса гриппа А (16 кДа), был сконструирован на основе штамма A/Kurgan/5/05. Синтез соответствующего фрагмента кДНК гена гемагглютинина осуществляли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с праймерами H562-284-P (5'-GCGGATCCGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATT-3') и H562-284-M (5'-CGTCTAGATTATTCACCTTTTCATAATTA-TTGTTGAGTCCCCCT-3'). Амплифицированный фрагмент клонировали по сайтам рестрикции BamHI и XbaI в вектор pQE30 («Qiagen N.V.», Германия). Рекомбинантный белок HA62/284 был экспрессирован в клетках *Escherichia coli* штамма M15 и очищен по стандартной методике (21). Рекомбинантный белок массой 26 кДа, содержащий эпитоп M2e (23 а.о.) белка M2 вируса гриппа А, слитый с белком дегидрофолатредуктазой, экспрессировали и очищали согласно описанию (11). Комплексы СЧ—

HA62/284-M2e получали *in vitro* при инкубации белков HA62/284, M2e и СЧ в массовом соотношении 5:5:100 при 25 °С в течение 20 мин.

Образцы для электронной микроскопии готовили в соответствии с ранее описанным протоколом (22). Препараты изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL», Япония), оснащенного цифровой фотокамерой ES500W Erlangshen («Gatan», Япония). Микрофотографии анализировали в программе ImageJ (National Institutes of Health, США).

Антигенную специфичность комплекса СЧ—HA62/284-M2e исследовали методом иммунофлуоресцентной микроскопии (23). В качестве первичных антител использовали антисыворотку кролика, полученную к белку HA62/284, и мышиную антисыворотку к белку M2e вируса гриппа в разведении 1:100. В контрольных образцах стадия добавления первичных антител отсутствовала. Связывание первичных антител с комплексами детектировали при помощи вторичных ослиных антикроличьих антител, конъюгированных с флуорофором Alexa Fluor® 546 («Invitrogen», США), или вторичных куриных антимышиных антител, конъюгированных с флуорофором Alexa Fluor® 488 («Invitrogen», США). Анализ проводили с применением флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия) с интегрированной камерой ORCAII-ERG2 («Hamamatsu», Япония).

Иммуногенность комплексов СЧ—HA62/284-M2e изучали на самках лабораторных беспородных белых мышей в возрасте 6-8 нед массой 15-18 г, разделенных на 4 группы по 5 животных в каждой. Мышей внутрибрюшинно иммунизировали PBS (натрий-фосфатный буфер, phosphate-buffered saline; отрицательный контроль, I группа), свободными рекомбинантными белками HA62/284 и M2e (II группа), белками в смеси с адьювантом Фрейнда (III группа), комплексами СЧ—HA62/284-M2e (IV группа). Доза на одну инъекцию составляла 5 мкг HA62/284, 5 мкг M2e, 100 мкг СЧ; объем смеси, инъекцируемой животному, — 0,2 мл. Всего провели 3 иммунизации с 2-недельным интервалом. Кровь для анализа брали через 1 нед после последней иммунизации.

Титр пула антисывороток определяли методом непрямого иммуноферментного анализа с помощью Multiscan FC («Thermo Scientific», США), как описано ранее (12). В качестве антигенов использовали белки HA62/284 и M2e в концентрации 10 мкг/мл. Титром антисыворотки считали разведение, в котором оптическая плотность продукта ферментативной реакции вдвое превышала соответствующее значение в отрицательном контроле (неиммунная мышьяная сыворотка).

*Результаты.* Для создания кандидатной вакцины из очищенного препарата ВТМ посредством термической денатурации при 94 °С были получены частицы сферической формы. Для контроля их характеристик использовали просвечивающую электронную микроскопию (рис. 1). Размер полученных СЧ составил  $612 \pm 41$  нм.

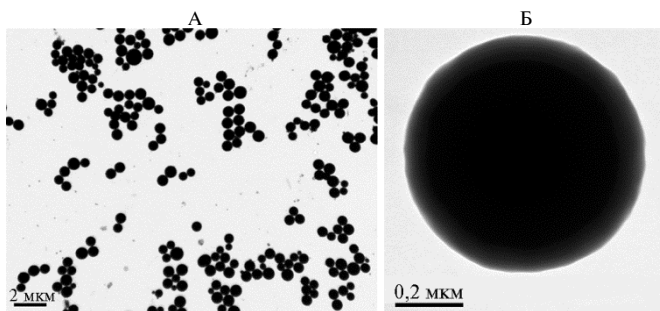
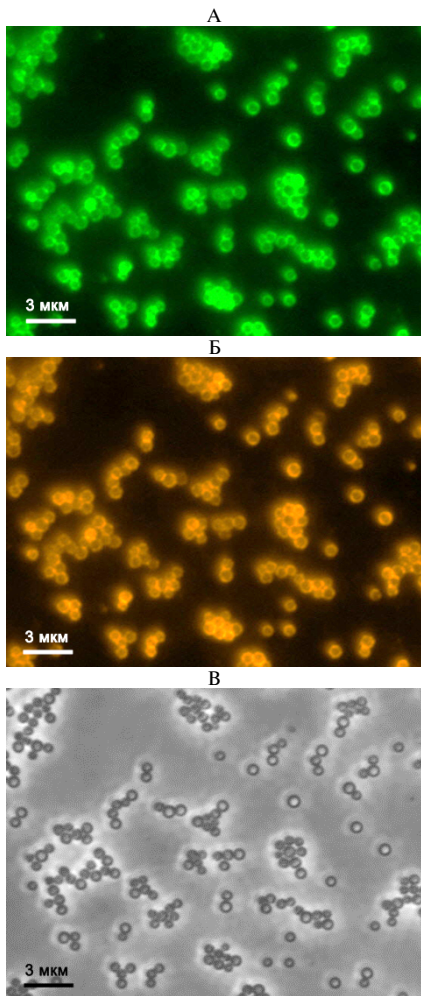


Рис. 1. Электронные микрофотографии сферических частиц, полученных при термической денатурации вируса табачной мозаики. Просвечивающая электронная микроскопия (JEM-1011, «JEOL», Япония); контрастирование 2 % уранилацетатом. Увеличение  $\times 10\,000$  (А) и  $\times 200\,000$  (Б).

В качестве антигенов вируса гриппа А выбрали участок молекулы гемагглютинина (62-284-й а.о.) штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1),



**Рис. 2.** Иммунофлуоресцентная микроскопия комплексов сферических частиц (СЧ), полученных при термической денатурации вируса табачной мозаики, с белками HA62/284 и M2e вируса гриппа, одновременно адсорбированными на поверхности СЧ: А — белок M2e, выявленный с помощью первичных мышечных антител и вторичных антител, конъюгированных с флуорофором Alexa Fluor® 488; Б — белок HA62/284, выявленный в том же образце с помощью первичных кроличьих антител и вторичных антител, конъюгированных с флуорофором Alexa Fluor® 546; В — соответствующее изображение образца, полученное в режиме фазового контраста. Флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия).

содержащий основные вируснейтрализующие эпитопы, и консервативный N-терминальный внеклеточный домен матриксного белка М2 (пептид М2е длиной 23 а.о.). Гемагглютинин — один из двух основных поверхностных белков вируса гриппа. Этот белок отвечает за связывание вириона с клеточными рецепторами и слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. HA представляет собой главный поверхностный антиген вируса гриппа и служит основной мишенью для нейтрализующих антител. Исследования показали, что район молекулы с 62-го по 284-й а.о. содержит большинство нейтрализующих эпитопов, а также структурные элементы, необходимые для эффективного фолдинга рекомбинантного белка (24). Мембранный белок М2 формирует ионные каналы в липопротеидной оболочке вириона. Фрагмент этого белка длиной 22 а.о. (внеклеточный домен М2 — М2е) экспонируется на внешней поверхности вирусной частицы. Пептид М2е эволюционно консервативен и практически идентичен для всех вирусов гриппа, циркулировавших в популяциях животных, включая пандемические вирусы. В связи с этим он может рассматриваться как перспективный эпитоп для разработки универсальной вакцины против гриппа (25).

В полученных *in vitro* комплексах СЧ—HA62/284-M2e, содержащих СЧ и рекомбинантные антигены HA62/284 и М2е вируса гриппа, белки на поверхности СЧ сохранили способность связываться со специфическими антителами к рекомбинантным белкам, что было подтверждено с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии с двумя различными флуорофорами. Флуоресценция на поверхности СЧ свидетельствовала о том, что оба антигена (HA62/284 и М2е) адсорбировались на одних и тех же сферических частицах и сохраняли антигенную активность в составе комплекса СЧ—HA62/284-M2e (рис. 2, А, Б). Сравнение полученных изображений в режиме флуоресценции (см. рис. 2, А, Б) и фазового контраста (см. рис. 2, В) показало, что все СЧ связаны с молекулами целевого белка, при этом агрегаты антигенных комплексов, не

ассоциированные с СЧ, отсутствуют. Следовательно, в анализируемом препарате не были обнаружены СЧ, свободные от антигена. В отрицательном контроле, когда рекомбинантные белки или первичные антитела к ним не использовались, флуоресценцию не наблюдали (данные не приведены), что свидетельствовало об отсутствии неспецифического взаимодействия антивидовых антител, конъюгированных с флуорофором, с поверхностью СЧ. Таким образом, было показано, что адсорбция белков НА и М2е на поверхности СЧ не препятствует их связыванию со специфическими антителами к рекомбинантным белкам вируса гриппа А.

Оценивая способность комплексов СЧ с белками НА и М2е гриппа А птиц стимулировать специфический иммунный ответ, лабораторных мышей иммунизировали свободными белками НА62/284 и М2е или комплексом СЧ—НА62/284—М2е. В сыворотках крови мышей, иммунизированных комплексом СЧ—НА62/284—М2е, наблюдалось значительное увеличение титра антител к вирусным антигенам по сравнению с таковым при введении свободных антигенов (в отсутствие СЧ). Так, при использовании СЧ, на поверхности которых одновременно адсорбированы белки М2е и НА62/284, титр антител к белку М2е составил  $2,0 \times 10^5$  (рис. 3, А), к белку НА62/284 —  $2,4 \times 10^5$  (см. рис. 3, Б). В отсутствие СЧ в группах мышей, иммунизированных смесью НА62/284 и М2е, титр антисывороток был менее  $4,0 \times 10^4$ . Титры антисывороток, полученные при иммунизации мышей смесью белков НА62/284 и М2е с использованием адьюванта Фрейнда (одного из самых сильных стимуляторов иммунного ответа, применяемого только в лабораторной практике), составляли  $3,0 \times 10^5$  и  $3,6 \times 10^5$  (см. рис. 3, А, Б). Таким образом, адсорбция НА62/284 и М2е на поверхности СЧ значительно усиливала иммуногенность рекомбинантных белков при внутрибрюшинных инъекциях: она приводила почти к 10-кратному увеличению концентрации антител к белкам НА62/284 и М2е в сыворотке крови иммунизированных животных по сравнению с показателем при иммунизации свободными белками, что по эффективности сопоставимо с использованием адьюванта Фрейнда.

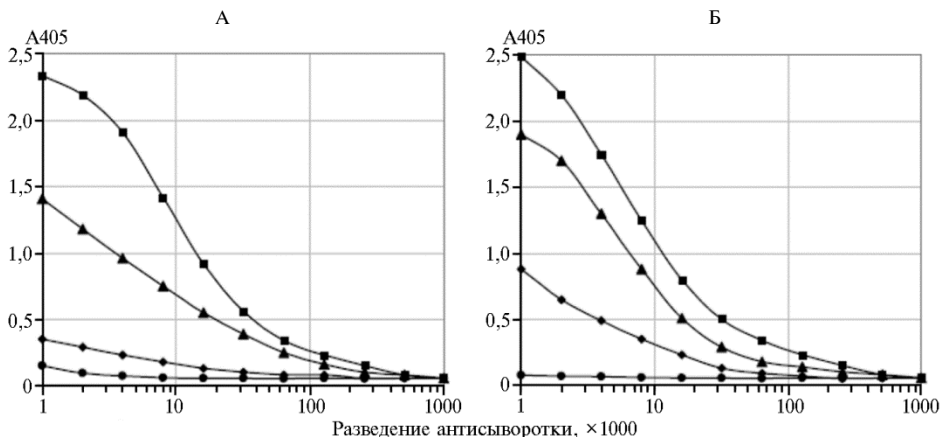


Рис. 3. Адьювантные свойства сферических частиц (СЧ), полученных при термической денатурации вируса табачной мозаики, в составе кандидатной вакцины — комплекса с антигенными детерминантами вируса гриппа А птиц НА62/284 и М2е (СЧ—НА62/284—М2е) (иммуноферментный анализ). На микропланшете иммобилизованы антигены М2е (А) и НА62/284 (Б) в концентрации 10 мкг/мл. Приведены кривые титрования антисывороток при иммунизации лабораторных мышей смесью свободных антигенов (♦), их смесью с добавлением адьюванта Фрейнда (■) и комплексом с СЧ (▲); контроль — неиммунная сыворотка (иммунизация раствором PBS (натрий-фосфатный буфер, phosphate-buffered saline) (●).

Важно отметить, что получение ветеринарных вакцин на основе структурно модифицированных вирусов растений (СЧ) позволяет создать отечественные маркерные ветеринарные вакцины: сферические частицы, на которые вырабатывается определенная часть антител при вакцинации комплексом СЧ—патоген (26), могут выступать и в роли маркера, что в дальнейшем позволит отличить вакцинированных птиц от носителей полевого вируса.

Итак, полученные комплексы СЧ—НА62/284—М2е могут быть основой для создания современной рекомбинантной вакцины против вируса гриппа птиц. Преимущество подобного подхода при создании вакцинных препаратов заключается в их высокой эффективности, основанной на стабильности и адьювантной активности сферических частиц, а также безопасности и низкой себестоимости использования вирусов растений. Включение в состав разработанного вакцинного препарата консервативного пептида М2е должно обеспечить защиту как от сезонных, так и от вероятных пандемических вирусов. Кроме того, это маркерная вакцина, позволяющая различать вакцинированных и невакцинированных особей, что важно для оздоровления промышленных популяций птицы.

*Авторы выражают благодарность А.Д. Соловьевой и Т.В. Гасановой за помощь в получении рекомбинантных антигенов.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nikitin N., Petrova E., Trifonova E., Karpova O. Influenza virus aerosols in the air and their infectiousness. *Adv. Virol.*, 2014, 2014: 1-6 (doi: 10.1155/2014/859090).
2. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. Режим доступа: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/2017\\_02\\_14\\_tableH5N1.pdf?ua=1](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2017_02_14_tableH5N1.pdf?ua=1). Без даты.
3. Huber V.C. Influenza vaccines: from whole virus preparations to recombinant protein technology. *Expert Rev. Vaccines*, 2014, 13(1): 31-42 (doi: 10.1586/14760584.2014.852476).
4. Treanor J.J., Wilkinson B.E., Maseoud F., Hu-Primmer J., Battaglia R., O'Brien D., Wolff M., Rabinovich G., Blackwelder W., Katz J.M. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, 2001, 19(13-14): 1732-1737 (doi: 10.1016/S0264-410X(00)00395-9).
5. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A., Stephenson I., Wood J., Ypma E., Zambon M.C. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 2001, 357(9272): 1937-1943 (doi: 10.1016/S0140-6736(00)05066-2).
6. Blanchfield K., Kamal R.P., Tzeng W., Music N., Wilson J.R., Stevens J., Lipatov A.S., Katz J.M., York I.A. Recombinant influenza H7 hemagglutinins induce lower neutralizing antibody titers in mice than do seasonal hemagglutinins. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2014, 8(6): 628-635 (doi: 10.1111/irv.12285).
7. Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K., Zharikova D., Hoff H., Wunner W., Couch R.B., Gerhard W. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol. J.*, 2006, 6(3): 102 (doi: 10.1186/1743-422X-3-102).
8. Acosta-Ramírez E., Pérez-Flores R., Majeau N., Pastelin-Palacios R., Gil-Cruz C., Ramírez-Saldaña M., Manjarrez-Orduño N., Cervantes-Barragán L., Santos-Argumedo L., Flores-Romo L., Becker I., Isibasi A., Leclerc D., López-Macías C. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology*, 2008, 124(2): 186-197 (doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02753.x).
9. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell Physiol.*, 2008, 216(2): 366-377 (doi: 10.1002/jcp.21423).
10. Manuel-Cabrerera C.A., Márquez-Aguirre A., Rodolfo H.G., Ortiz-Lazareno P.C., Chavez-Calvillo G., Carrillo-Tripp M., Silva-Rosales L., Gutiérrez-Ortega A. Immune response to a potyvirus with exposed amino groups available for chemical conjugation. *Virol. J.*, 2012, 9: 75 (doi: 10.1186/1743-422X-9-75).

11. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platform and foreign antigens. *J. Gen. Virol.*, 2012, 93(2): 400-407 (doi: 10.1099/vir.0.036293-0).
12. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2014, 32(8): 1193-1201 (doi: 10.1080/07391102.2013.816868).
13. Lebel M.E., Daudelin J.F., Chartrand K., Tarrab E., Kalinke U., Savard P., Labrecque N., Leclerc D., Lamarre A. Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.*, 2014, 192(3): 1071-1078 (doi: 10.4049/jimmunol.1302030).
14. Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Paré C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine*, 2008, 26(27-28): 3395-4003 (doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.052).
15. Mathieu C., Rioux G., Dumas M.C., Leclerc D. Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine*, 2013, 9(7): 839-848 (doi: 10.1016/j.nano.2013.02.009).
16. Атабеков И.Г., Никитин Н.А., Карпова О.В. Новый тип платформ для сборки вакцин in vitro. Вестник Московского университета, Серия 16. Биология, 2015, 4: 29-35.
17. Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Биобезопасность вирусов растений для человека и животных. Вестник Московского университета, Серия 16. Биология, 2016, 3: 20-26.
18. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. *J. Gen. Virol.*, 2011, 92(2): 453-456 (doi: 10.1099/vir.0.024356-0).
19. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on the thermally modified virus particles. *Polym. Sci. Ser. A*, 2011, 53(11): 1026-1031 (doi: 10.1134/S0965545X11110083).
20. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц — новых биогенных платформ. Вестник Московского университета, Серия 16, Биология, 2015, 4: 46-50.
21. Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Kozlovsky S.V., Nikitin N.A., Smirnov A.A., Susi P., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Mutagenic analysis of Potato Virus X movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol. Plant Pathol.*, 2008, 9(1): 37-44 (doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00445.x).
22. Nikitin N., Trifonova E., Evtushenko E., Kirpichnikov M., Atabekov J., Karpova O. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0142415 (doi: 10.1371/journal.pone.0142415).
23. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis. *Microsc. Microanal.*, 2013, 19(4): 808-813 (doi: 10.1017/S1431927613000597).
24. Song L., Nakaar V., Kavita U., Price A., Huleatt J., Tang J., Jacobs A., Liu G., Huang Y., Desai P., Maksymiuk G., Takahashi V., Umlauf S., Reiserova L., Bell R., Li H., Zhang Y., McDonald W.F., Powell T.J., Tussey L. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PLoS ONE*, 2008, 3(5): e2257 (doi: 10.1371/journal.pone.0002257).
25. Deng L., Cho K.J., Fiers W., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccines. *Vaccines*, 2015, 3(1): 105-136 (doi: 10.3390/vaccines3010105).
26. Trifonova E., Zenin V., Nikitin N., Yurkova M., Ryabchevskaya E., Putlyayev E., Donchenko E., Kondakova O., Fedorov A., Atabekov J., Karpova O. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus. *Antiviral Res.*, 2017, 144: 27-33 (doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.006).

ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова,  
 Биологический факультет,  
 119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12,  
 e-mail: olgakond1@yandex.ru

Поступила в редакцию  
 27 апреля 2017 года

## OF STRUCTURALLY MODIFIED PLANT VIRUS

*O.A. Kondakova, E.A. Trifonova, M.V. Arkhipenko, N.A. Nikitin,  
O.V. Karpova, J.G. Atabekov*

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, str. 12, 1, Leninskie gory, Moscow, 119234 Russia,  
e-mail olgakond1@yandex.ru (corresponding author)*

ORCID:

Kondakova O.A. [orcid.org/0000-0001-5134-6624](https://orcid.org/0000-0001-5134-6624)

Trifonova E.A. [orcid.org/0000-0002-0679-6818](https://orcid.org/0000-0002-0679-6818)

Arkhipenko M.V. [orcid.org/0000-0002-5575-602X](https://orcid.org/0000-0002-5575-602X)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors thank A.D. Solov'eva and T.V. Gasanova for the assistance in constructing recombinant antigens.

Supported by Russian Science Foundation, a priority program for fundamental research (grant № 14-24-00007)

Received April 27, 2017

Nikitin N.A. [orcid.org/0000-0001-9626-2336](https://orcid.org/0000-0001-9626-2336)

Karpova O.V. [orcid.org/0000-0002-0605-9033](https://orcid.org/0000-0002-0605-9033)

Atabekov J.G. [orcid.org/0000-0003-3407-4051](https://orcid.org/0000-0003-3407-4051)

doi: 10.15389/agrobiologi.2017.4.731eng

### Abstract

Avian influenza is an infectious viral disease that affects various species of birds, including poultry (chicken, turkeys, ducks and geese). Vaccination is a key strategy in the prevention of epizootics and epidemics of influenza. Now, the actual problem is the development of rapid, safe and effective methods for the production of avian flu vaccines. The using of recombinant flu antigen is a promising approach for creating universal, safe and effective poultry flu vaccines. To increasing of low immunogenicity of recombinant antigens plant viruses and virus-like particles can be applied. We have previously shown that spherical particles (SPs) with unique adsorption property and immunostimulating activity. Here we design the candidate vaccine against the avian flu virus (H5N1). The complexes containing the antigenic determinants of the avian flu virus — hemagglutinin (HA) and the extracellular domain of the M2 matrix protein (M2e) presented on the surface of SPs were developed. By indirect immunofluorescence microscopy the specific antigenic activity of recombinant proteins adsorbed on the SPs surface were demonstrated. The SPs—HA—M2e (SPs—HA62/284—M2e) complexes were highly immunogenic. The candidate vaccine induced a strong humoral immune response to both antigenic determinants of avian flu A virus. HA and M2e adsorption on the SPs allowed a 10-fold increase in the production of blood antibodies to antigens in immunized animals. The advantage of this approach for the vaccine development is high efficiency based on the stability and adjuvant activity of SPs, safety and low cost of using plant viruses. Obtaining veterinary vaccines based on structurally modified plant viruses allows the creation of marker veterinary vaccines. Development and creation of marker vaccines is extremely important for the recovery of the poultry population in agro-industrial complexes. The proposed vaccine can be considered as a candidate recombinant vaccine against avian influenza virus.

Keywords: plant viruses, vaccines, spherical particles, influenza virus, recombinant proteins.

### Научные собрания

Выставка-конкурс проходит в рамках  
Петербургского международного  
форума здоровья

11–13  
ОКТЯБРЯ 2017

**БИОИНДУСТРИЯ**  
**МЕЖДУНАРОДНАЯ**  
**ВЫСТАВКА-КОНКУРС**  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ | ЭКСПОФОРУМ